Istituto di Medicina Operativa della Regia Università di Palermo

S 380

Ricerche istochimiche sulle sostanze lipoidi degli elementi morfologici del sangue.

Dott. N. BARBARO
Capitano Medico

I. COMUNICAZIONE

MILANO
CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
Corso Magenta, N. 48.

1914

Istituto di Medicina Operativa della Regia Università di Palermo

Ricerche istochimiche sulle sostanze lipoidi degli elementi morfologici del sangue.

Dott. N. BARBARO
Capitano Medico

I. COMUNICAZIONE

MILANO
CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
Corso Magenta, N. 48.

1914

Estratto dalla *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche*
N. 65 — Anno 1914

Stab. della Casa Edit. Dr. F. VALLARDI, Milano.

Tecnica. — L'esame chimico del sangue ci fa rilevare così nel siero come negli elementi morfologici la presenza di sostanze lipoidi.

Di queste alcune sono costituenti essenziali, costanti, poco o punto variabili; altre sono l'espressione del metabolismo di tali elementi cellulari (fagocitosi ed eventuale ulteriore elaborazione dei grassi fagocitati, per azione, forse, di fermenti).

La 1.ª specie di lipoidi chimicamente è stata dimostrata sia nei corpuscoli rossi che nei bianchi, e parrebbe, dalle ricerche più recenti, ch'essi siano rappresentati da colesterina libera, fosfatidi, cerebrosidi e tracce di acidi grassi.

Dal punto di vista istochimico, in condizioni normali, le sostanze lipoidi della 1.ª categoria (i costituenti, cioè, essenziali degli elementi cellulari) non sono sicuramente dimostrabili, perchè i reattivi fin'ora in uso mettono in evidenza solo le sostanze lipoidi libere, mentre verosimilmente queste esistono, almeno normalmente, in combinazione più o meno stabile con le proteine.

Quelle della 2.ª categoria possono essere dimostrate dai reattivi attualmente in uso.

I metodi istochimici che si applicano per gli elementi cellulari in genere non corrispondono, di solito, egualmente bene per il sangue e ciò per alcune speciali condizioni, quali l'essiccamento del sangue, lo strisciamento sui vetrini, la facile formazione di precipitati coi reattivi, l'azîone diretta brusca di questi ultimi . . . . . ecc.

Per la dimostrazione in genere delle sostanze lipoidi possediamo, fin' ora, i seguenti procedimenti:

1.ª *Colorazione vitale di Cesaris Demel*, la quale consiste nel montare sopra un portaoggetti, sul quale precedentemente è stata strisciata una soluzione alcolica di Sudan III, un coproggetti con sangue fresco.

Si deve osservare istantaneamente, perchè dopo alcuni minuti si vedono formazioni certo non preesistenti.

Questo processo si può interpretare con ogni probabilità in 2 maniere:

a) che alla periferia delle cellule esista una membrana nel senso di Overton, permeabile per il Sudan, il quale, penetrato nella cellula, si distribuisce a sua volta nelle sostanze grasse.

b) che allo stesso modo come i leucociti assumono per fagocitosi sostanze estranee (polvere di carbone, cinabro, microrganismi, ecc.), possano assumere il Sudan, che poi si scioglie nelle gocciole di grasso con le quali s'incontra o resta in granuli inerti. (È però vero che un occhio esercitato può distinguere i granuli di Sudan da quelli di grasso colorato).

La colorazione vitale di Cesaris Demel entra nel gruppo delle colorazioni vitali elettive, perchè il Sudan colora elettivamente le sostanze grasse.

Ma bisogna considerare anche un'altra serie d'indagini.

Le cellule, come si sa, si lasciano ordinariamente penetrare dai colori basici di anilina e specialmente da quelli della serie delle *azine* (*tioazine*: toluidina, tionina, azur; *oxazine*: brillantcresylblau, nil blau).

Queste sostanze, penetrate nella cellula, si distribuiscono in date formazioni: ricordo la colorazione delle granulazioni di Ehrlich, di alcuni granuli di mononucleati (Cesaris Demel, Ferrata, Pappenheim), il cromomero delle piastrine, la sostanza granulo-filamentosa e metacromatica di alcune emazie (Rosin, Bibergil, Ito, Cesaris Demel, Pappenheim, ecc).

In base al principio di Overton-Mayer, col quale è ammesso che nella cellula penetrano le sostanze solubili nei lipoidi, si è indotti ad ammettere che le formazioni colorabili colle tinte suddette siano di natura lipoide. Questa è però una ipotesi, più o meno verosimile, ma non del tutto dimostrata.

D'altra parte recentemente il Pappenheim ha emesso l'opinione che molte delle formazioni messe in evidenza con le colorazioni vitali non preesistano come tali nella cellula, ma

siano l'espressione di una lipo-lisi effettuata dai colori stessi, i quali sarebbero (come per altro è provato) nocivi per la cellula.

Ed infine Hammar, osservando il sangue in tempi diversi dopo l'estrazione (e cioè in autolisi) ha visto un aumento straordinario di formazioni colorabili con le tinte vitali.

2.° *Colorazioni stabili.* Di questa categoria possediamo procedimenti più o meno rispondenti allo scopo.

Ricordo il metodo di Buttino e Quarelli che consiste nel fissare il sangue sui vetrini ai vapori di formalina e colorare poscia con una soluzione diluita di Sudan III; lavare rapidamente in acqua, sovrapporre una colorazione di contrasto e montare in glicerina.

Il procedimento di Ciaccio che consiste nel lasciar essicare il sangue all'aria, trattarlo con miscela osmio-bicromica e colorarlo con Sudan ed emallume.

Quello più recente di Spadaro, al tetrossido di osmio.

Come si vede mentre la tecnica istochimica per la ricerca delle sostanze lipoidi nei tessuti in genere è ben progredita, per quanto riguarda il sangue ci troviamo ancora in presenza di metodi incompleti e che nulla ci dicono della specie di sostanze grasse messe in evidenza

Ho creduto perciò non privo d'importanza intraprendere una serie di ricerche coi metodi d'analisi istochimica che oggi sono più in uso.

Naturalmente ho dovuto modificare le rispettive tecniche e adattarle alle speciali condizioni del sangue, così diverse da quelle degli altri tessuti.

I metodi più comunemente usati sono:

1.° *Metodi fisici:* (refrangenza).

2.° *Colorazione vitale.*

3.° *Preparati stabili.*

Quest'ultima categoria comprende:

a) Metodi per la dimostrazione delle sostanze grasse e lipoidi in genere.

Metodo Ciaccio, o passaggio nella fase insolubile dopo azione di liquidi cromici.

c) Metodi di Smith-Dietrich e di Fischler, fondati sulla formazione di lacche cromo e cupro-ematossiliniche.

Ricordo per incidenza che recentemente lo Schultze, adoperando il metodo Smith-Dietrich lievemente modificato, è ve-

nuto alla conclusione che i granuli eosinofili contengano una sostanza lipoide. Ciò era veramente già noto; i trattati di tecnica dicono infatti che generalmente i metodi fondati sulla formazione di lacca ematossilinica colorano anche i granuli eosinofili. Però quest'autore ha visto che la lacca non si produce più se si fa precedere un trattamento coi solventi dei grassi.

a) Il punto capitale di questi metodi è la *fissazione*. Il sangue facilmente si emolizza; d'altra parte, adoperando il metodo Buttino e Quarelli si ha l'inconveniente che alcune sostanze lipoidi eventualmente possono essere disciolte; e di ciò una prova si ha nel fatto che con questo metodo si vedono, a identità di condizioni, i sudanofili in quantità minore che col procedimento da me usato. Perciò ho pensato di evitare questo grave inconveniente insolubilizzando le sostanze, che protrebbero essere disciolte.

Dopo molti tentativi, ho trovato che il seguente procedimento si presta assai bene:

1) Fissazione ai vapori di formalina:

Preparare i vetrini coproggetti *rigorosamente* sgrassati, detersi ed asciutti ed esporli per 15-20 minuti ai vapori di formalina (40 %), o per 4-5 minuti ai vapori d'acido osmico (soluzione recente al 2 %): coi vapori di formalina parmi che si ottengano preparati assai nitidi.

Pungere, con le solite regole, il polpastrello di un dito lavato con alcool e perfettamente asciutto, strisciare una piccolissima goccia di sangue tra 2 vetrini dalla parte già esposta ai vapori di formalina o di tetrossido di osmio e stendere così il sangue su parecchi vetrini; esporlo per 15-20 minuti ai vapori di formalina o ~~di osmio~~ per 4'-5' a quell' di osmio

2) Passaggio in soluzione formol cromica:

Bicromato di potassa	gr. 4
Acqua distillata e filtrata.	» 100

Filtrare al momento dell'uso ed aggiungere:

Formalina	gr. 20

(Si può aggiungere, o no, qualche goccia d'acido acetico:)

I vetrini, tra 2 fogli di carta da filtro, si tengono in recipiente ben chiuso nella miscela suddetta per 48 ore, cambiando il liquido dopo 24 ore.

3) Cromizzazione;

Lavare poscia i vetrini abbondantemente in acqua distillata e metterli a cromizzare, in carta da filtro, per qualche giorno (1-5) in soluzione di bicromato di potassa al 4 %, filtrata, cambiando il liquido al massimo ogni 2 giorni.

Togliere alcuni vetrini dalla soluzione formio-cromica, o formio-cromo-acetica al 2.° giorno, alcuni dopo altri 2 giorni di cromizzazione, altri dopo 5 o più giorni.

4) Colorazione:

Lavare per circa 1 ora sotto acqua corrente i vetrini, risciacquandoli poscia a lungo in acqua distillata filtrata; passarne alcuni in soluzione acquosa satura di Nil-blau, altri in alcool a 50 e a 70 per alcuni minuti e poi in soluzione alcoolica satura di Sudan III (in alcool a 80 col 10 % di acetone) per 1 ora.

Col Nil-blau si possono colorare anche dopo semplice fissazione in formalina (come in 1); nell'un caso e nell'altro i preparati colorati col Nil-blau si devono osservare subito, perchè facilmente si scolorano. Occorre adoperare una soluzione concentrata, recente e che agisca per un tempo piuttosto lungo (non meno di due ore). Dopo colorazione si mordenza (o no) il preparato *fugacemente* in soluzione di acido acetico e si lava poi abbondantemente in acqua corrente ed acqua distillata; si include in glicerina *rigorosamente* neutra, oppure si osserva direttamente in acqua. Se si vuol conservare più a lungo occorre luttare il preparato.

Ricordo altresì che la soluzione di Sudan III, preparata da alcuni giorni, va sempre tenuta in termostato a 37, che al momento in cui si usa deve avere la temperatura ambiente, che si deve filtrare su carta assai spessa ed in recipiente perfettamente asciutto, leggermente concavo, nel quale si colloca il vetrino rovesciato e si copre. Queste precauzioni sono indispensabili per evitare i depositi di granuli di Sudan, che facilmente s hanno sul preparato, essendo di somma importanza che questo sia *assolutamente pulito.*

5) Lavaggio;

Tolti i vetrini, dopo un'ora dalla soluzione di Sudan, si risciacquano diligentemente in alcool a 50 cambiato 1 volta, (finchè non sia scomparsa ogni traccia di depositi di Sudan) poi sotto forte getto di acqua corrente ed infine con acqua distillata filtrata.

6) Colorazione di contrasto;

I vetrini colorati in Sudan e lavati si colorano in Emallume filtrato per 30-40 minuti; poscia si lavano ancora in acqua distillata e filtrata, lasciandoli in quest'ultima per un quarto d'ora o più.

7) Montaggio:

Si montano in gomma-sciroppo di Apathy e si possono conservare indefinitamente.

Egualmente faccio *per il processo Ciaccio:* lasciando invariate le modalità suddette, interpongo tra la cromizzazione e la colorazione l'azione dei solventi.

Tolti i vetrini dal liquido cromico e lavati, come sopra è detto, li passo in alcool a 50, a 70, ordinario, assoluto I, assoluto II, xilolo I, xilolo II, (circa 1 minuto in ogni alcool e non più di 5 minuti in xilolo); dallo xilolo II in alcool assoluto per 5 minuti, agitando, poi in alcool ordinario ed in Sudan III.

Per il metodo Smith-Dietrich:

Vetrini fissati come in 1) e messi in carta da filtro in soluzione acquosa satura di bicromato di potassa, si tengono al termostato a 37-40: alcuni si tolgono dopo 24, altri dopo 48 ore. Si possono anche adoperare preparati con qualche giorno di cromizzazione.

Lavati abbondatemente in acqua distillata, si colorano con ematossilina acetica:

1.° Ematossillina	gr.	1
Alcool assoluto	»	10

Soluzione vecchia di almeno un mese.

2.° Soluzione concentrata di carbonato di litio . .	gr.	0,1
Acqua distillata	»	9

Si mescola 1 p. della soluzione 1°) con 9 p. della soluzione 2°), o, più semplicemente, si diluisce la soluzione 1.° in acqua distillata e filtrata nel rapporto 1:10. Si aggiungono in entrambi i casi 1-2 gocce di acido acetico.

La colorazione si protrae per 4-5 ore a 37°-40.° si lava poscia in acqua distillata e si differenzia in soluzione di ferricianuro potassico diluitissima:

Ferricianuro potassico	gr.	2,5
Borace	»	2
Acqua distillata.	»	100

I vetrini, che si sorvegliano al microscopio, devono differenziare assai lentamente e conservare sempre la tinta leggermente bruna. Si estraggono poscia dalla soluzione di ferro, si lavano e si montano in gomma o in balsamo.

Per il metodo Fischler:

Vetrini fissati come in 1). Si mordenzano in soluzione acquosa satura di acetato di rame per 4-6-12 ore in termostato a 37.°. Si lavano poi abbondantemente in *acqua distillata* e si colorano per circa mezz' ora in ematossilina (soluzione di ematossilina come col metodo precedente, senza acido acetico).

Si lavano in acqua distillata e si differenziano in ferricianuro come col metodo Smith, e *diluito ancor più* che con quest'ultimo, fino a decolorare i globuli rossi; si lavano ancora e si montano in gomma-sciroppo di Apasthy.

Con questo metodo si colorano non solo gli *acidi grassi*, ma anche la calce, il ferro, le granulazioni delle mastzellen e degli eosinofili.

Risultati che si ottengono coi procedimenti suddetti:

1.° I metodi fisici ci dicono qualche cosa sulla birefrangenza la quale, come è noto, e come risulta dalle ricerche di Aschoff,

Kawamura, Kaiserling, Kasarinoff, Ciaccio, ecc., è dovuta agli *eteri di colesterina, ad alcune miscele colesteriniche con acidi grassi e fosfatidi, ai fosfatidi saturi, ai cerebrosidi, ai saponi, alle miscele di fosfatidi insaturi + colesterina.*

2.° Le colorazioni vitali danno risultati positivi con gli *acidi grassi* e rispettivamente coi *saponi e coi fosfatidi e cerebrosidi.*

3.° Il *Sudan* con alcune sostanze si colora in giallo arancio (coi *fosfatidi*, *cerebrosidi ed eteri di colesterina*); con altre in rosso arancio (*coi saponi ed acidi grassi*).

Il *Nil blau* dà tinta rossa con gli *eteri di glicerina*, rossastra con gli *eteri di colesterina*, rosso-bleu con *miscele di colesterina + eteri di glicerina*, bleue bluastro con *acidi grassi, fosfatidi e cerebrosidi.*

4.° Il *metodo Ciaccio*, dopo breve cromizzazione, mette in evidenza i *fosfatidi insaturi associati o non alla colesterina*, successivamente i *fosfatidi saturi*, *gli acidi grassi insaturi* e *le miscele colesteriniche.* È negativo per gli *eteri di glicerina e di colesterina puri.*

5.° Il metodo Smith-Dietrich, dopo cromizzazione di un giorno, colora *fosfatidi*, *cerebrosidi* e *miscele colesteriniche;* dopo 48 ore anche *acidi grassi e saponi.* È negativo per gli eteri.

6.° Il metodo Fischler colora gli *acidi grassi.*

Considerazioni critiche: È fuor di dubbio che, adoperando con discernimento questa serie di metodi, si possa stabilire a qual gruppo appartenga una data sostanza grassa.

Giova però ricordare che, mentre alcuni di questi metodi sono elettivi, altri non sono tali (ad es. sono elettivi i metodi che si fondano sulla colorazione col Sudan, e cioè quello da me esposto, e quello della colorazione col Nil-blau).

Per quanto riguarda i metodi di Smith-Dietrich e di Fischler la cosa non è così semplice come potrebbe a prima vista apparire: infatti noi possiamo, a priori, ammettere che non certi grassi solamente, ma tutte le sostanze capaci di combinarsi col cromo e col rame debbano dare una lacca più o meno resistente alla differenziazione secondo che la combinazione è più o meno stabile Perciò prima di caratterizzare come lipoide puro o mescolato con altre sostanze una formazione colorabile con queste lacche, è necessario aver altri elementi di giudizio, fornitici dagli altri metodi elettivi, dall'azione dei solventi, ecc.

Sostanze grasse	Birefragenza	Colorazioni vitali	Colorazione col Sudan	Colorazione col Nil-blau	*Col metodo Ciaccio*	*Col metodo Smith-Dietrich*	Col metodo Fischler	Con tetrossido di osmio dopo cromizzazione e passaggio in alcool
Colesterina + Acidi grassi....	+	—	rosso-arancio	rossastro	+ dopo 48 ore di fissazione e 7 giorni di cromizzazione.	+ Dopo 24-48 ore.	—	nero
Colesterina + Fosfatidi saturi.	+	—	arancio debole	bluastro	idem.	idem.	—	bruno
Colesterina + Fosfatidi insaturi	+	—	idem.	bluastro	+ Dopo 24-48 ore di fissaz.	idem.	—	bruno
Colesterina + Eteri di glicerina	?	—	arancio	rosso-bleu	+ Dopo lunga cromizzazione	+ dopo 2-3 giorni.	+ (Kawamura)	nero
Eteri di colesterina.....	+	—	giallo-arancio	rossastro	—	—	—	nero
Eteri di glicerina.....	—	—	rosso-arancio	rosso	—	—	—	nero intenso
Fosfatidi.....	—	+	giallo-arancio debole	bleu-bluastro	—	+ Dopo 1 giorno di cromizzazione.	?	bruno
» saturi.....	+	+	idem.	idem.	+ Dopo 48 ore di fissazione e 3-4 giorni di cromizzazione	id.	—	idem.
» insaturi.....	—	+	idem.	idem.	+ Dopo 24-48 ore di fissazione.	id.	—	idem.
Acidi grassi saturi.....	—	+	rosso-arancio	bleu	—	+ Dopo 2 giorni di cromizzazione.	+	nero
» » insaturi.....	—	+	idem.	idem	+ Dopo 7 giorni di cromizzazione.	—	+	
Cerebrosidi.....	+	+	giallo-arancio	bluastro	—	+ Dopo 1 giorno di cromizzazione.	—	brunastro
Saponi.....	+	+	rosso-arancio	bleu	(Si sciolgono già durante la fissazione).	+ Dopo 2 giorni di cromizzazione (?).	+	nero

D'altra parte il metodo Fischler, a parte possibili errori, non solo mette in evidenza gli *acidi grassi*, ma anche, secondo Kawamura e Dietrich, alcune *miscele colèsteriniche*, e, secondo Ciaccio, alcuni *fosfatidi*; pare però che la lacca formata sugli *acidi grassi* sia più resistente alla differenziazione. Ed è perciò necessario differenziare a lungo, fino a completa decolorazione dei globuli rossi.

Con questi metodi e criterî ho istituito una serie di ricerche sistematiche sul sangue, le quali faranno oggetto di una 2.ª comunicazione.

All'illustre prof. Ciaccio che, con tanta benevolenza, ha voluto interessarsi di queste mie ricerche e controllarne i risultati, l'espressione di tutta la mia gratitudine.

N. B. Per una più minuta descrizione e per il valore dei singoli metodi riscontrare:

Aschoff. Zeigler's Beiträge Bd. 47. — *Kaiserling*. Berl. med. Woch. 1910. — *Kasarinoff*. Ziegler's Beiträge Bd. 49. — *Kawamura*. Jena. Fischer 1911. — *D'Agata*. Mattei e Speroni. Pavia. — *Ciaccio*. Biologie medicale 1912. — *Biondi*. Folia Neurologica 1913.